

09/477,730



日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年12月 2日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第343937号

出願人

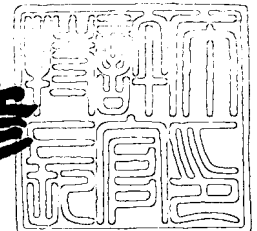
Applicant (s):

日本製紙株式会社

2000年 3月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3021029

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA-45BI0J0

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/65  
C12N 15/82

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区王子 5 丁目 2 1 番 1 号 日本製紙株式会社中央研究所内

【氏名】 杉田 耕一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区王子 5 丁目 2 1 番 1 号 日本製紙株式会社中央研究所内

【氏名】 海老沼 宏安

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区王子 5 丁目 2 1 番 1 号 日本製紙株式会社中央研究所内

【氏名】 金田 三佳

【特許出願人】

【識別番号】 000183484

【氏名又は名称】 日本製紙株式会社

【代表者】 小林 正夫

【代理人】

【識別番号】 100074572

【弁理士】

【氏名又は名称】 河澄 和夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012553

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704982

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規選抜マーカーを用いた植物への遺伝子導入用ベクター

【特許請求の範囲】

【請求項1】 目的遺伝子、及び選抜マーカー遺伝子として植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子を含むことを特徴とする、植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項2】 目的遺伝子、選抜マーカー遺伝子として植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子、及び脱離能を有するDNA因子を含み、かつ、選抜マーカー遺伝子はこの脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に存在し、また目的遺伝子は、この脱離能を有するDNA因子とは挙動を一つにすることがない位置に存在する、植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項3】 選抜マーカー遺伝子が脱離能を有するDNA因子の内部に存在する、請求項2に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項4】 選抜マーカー遺伝子として植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子と共に植物ホルモン合成系遺伝子を含む、請求項1、2又は3に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項5】 植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子がサイトカイニンシグナルトランスダクション系遺伝子である、請求項1、2、3又は4に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項6】 サイトカイニンシグナルトランスダクション系遺伝子がシロイヌナズナ由来のCKI1遺伝子である、請求項5に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項7】 植物ホルモン合成系遺伝子がサイトカイニン合成系遺伝子である、請求項4に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項8】 サイトカイニン合成系遺伝子がアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) のT-DNA上に存在する ipt (isopentenyltransferase) 遺伝子である、請求項7に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項9】 脱離能を有するDNA因子が部位特異的組換え系に由来する

ものである、請求項 2、3、4、5、6、7 又は 8 に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学的手法により目的遺伝子を植物に導入して形質転換植物を得る際に有用な新規ベクターに関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子工学技術を利用した微生物、培養細胞などの形質転換は、現在、医薬品として有用な生理活性物質の生産等の目的に応用され、実産業においても多大の貢献をなしている。一方、植物育種の分野においてこの技術は、目的とする遺伝子を直接、育種の対象となる植物に導入することを可能とするため、（a）改変すべき形質のみが導入できる、（b）植物以外の種（微生物等）の形質も植物に導入できる、（c）育種期間の大幅な短縮ができるなど、交配を重ねて行う古典的な育種と比べて多くのメリットを有するものの、微生物等と比べて植物のライフサイクルが長いこと、植物細胞への遺伝子導入が容易ではなかったこと等の理由から、その実産業への適用についてはやや遅れをとっていた。しかしながら、現在では、欧米を中心に多くの有用な形質転換植物が作出され、既に市場に出回っている。

【0003】

具体的に、目的遺伝子を対象植物に導入し、遺伝子導入植物を作成するには（1）目的遺伝子の植物細胞への導入（染色体、核等に導入される場合も含む。）（2）目的遺伝子が導入された細胞のみからなる植物組織の選抜、（3）選抜された植物組織からの植物体の再生、の 3 段階を必ず経ることになる。このうち目的遺伝子導入組織の選抜にあたっては、一般に、目的遺伝子の発現している組織（目的遺伝子が発現している組織は、当然これが導入された細胞からなる組織である。）を、植物体を再生することなく、しかも肉眼で確認することが困難なことから、目的遺伝子は、細胞培養の段階でその発現が容易に検出できる選抜マ

一カー遺伝子と共に植物細胞に導入され、選抜マーカー遺伝子の発現の有無（すなわち選抜マーカー遺伝子の導入の有無）が目的遺伝子導入の指標として用いられるのが普通である。例えば、このような選抜マーカー遺伝子としては、抗生物質耐性を付与するカナマイシン抵抗性遺伝子（NPTII：ネオマイシンリン酸化酵素遺伝子）やハイグロマイシン抵抗性遺伝子（HPT：ハイグロマイシンリン酸化酵素遺伝子）、アミノ酸合成に関与するノパリン合成酵素遺伝子（NOS）やオクトピン合成酵素遺伝子（OCS）、農薬耐性を付与するスルフォニルウレア系抵抗性遺伝子（ALS：アセトラクテート合成酵素遺伝子）などがある。

## 【0004】

しかし選抜マーカー遺伝子の発現はまた、このような遺伝子導入植物を食用等に供することを目的とした場合、重大な障害となる。つまり、かかる選抜マーカー遺伝子が発現することによって生ずる遺伝子産物の、人体への安全性を担保することが非常に困難だからである。従って、これら選抜マーカー遺伝子を指標として作成された遺伝子導入植物を食品として販売する場合には、その遺伝子産物の人体への影響について詳細な調査が必要とされる。例えば、NPTII遺伝子は、既に1980年代前半から、選抜マーカー遺伝子として実験室レベルでは盛んに用いられてきたが、1994年になってようやく、その遺伝子産物が米国食品衛生局（FDA）により食品添加物として認可され、これを選抜マーカー遺伝子として用い、形質転換された遺伝子導入植物が食用等に供されるようになった。しかし、実際にこれを口にすることになる肝心の消費者レベルでは、このようなNPTII遺伝子産物への不安感は、依然として拭い去り難く存在し続けている。

## 【0005】

また現在、選抜マーカー遺伝子として実用化されているのは、このNPTII遺伝子を始め、植物細胞に対する成長阻害物質の解毒作用に寄与する遺伝子のみであり、それ故、目的遺伝子導入組織の選抜にあたっては、これら成長阻害物質を含む培地でその培養を行い、選抜マーカー遺伝子の発現の有無、つまりはかかる物質に対する耐性を評価し、これを指標とすることになる。しかしこの場合、耐性がある、すなわちかかる物質の存在下で植物組織が増殖するといっても、こ

れは程度の問題であり、このような阻害物質の存在下での培養が、植物細胞にとって好ましからぬ影響を与えることは避け難く、現実には、植物細胞の活性低下に伴う遺伝子導入組織の増殖、再分化率の低下等の副作用が問題となっている。

#### 【0006】

更に、遺伝子導入組織を選抜した後においては、選抜マーカー遺伝子の発現は、植物育種を目的とする研究者のレベルにおいても、大きな障害を与える。すなわち、ある選抜マーカー遺伝子を用いて作成された遺伝子導入植物に対して、更に別の遺伝子を新たに導入しようとする場合には、二度と、同一の選抜マーカー遺伝子を用いて遺伝子導入を行うことができない。既に、対象となる植物には、この選抜マーカー遺伝子が存在しているため、再びこれを、新たな目的遺伝子と共にその同じ植物に導入しても、新たな目的遺伝子が導入されようがされまいが、その植物においてはこの選抜マーカー遺伝子が恒常的に発現しており、これを目的遺伝子導入の指標とすることは、もはやできないからである。従って、ある植物に対して遺伝子導入を繰り返すことができる回数は、その植物に対して何種類の異なった選抜マーカー遺伝子を使用できるかによって、自ずから制約を受けることとなる。しかし、現在実用できる選抜マーカー遺伝子の種類はさして多くない。しかも、これらの選抜マーカー遺伝子全てが、対象となる植物に使用できるわけではないのである。

#### 【0007】

これらの問題を解決する手段として、本出願人は先に、特開平9-154580において新規なベクターを提供した。このベクターは選抜マーカー遺伝子として、自然界においても植物中に存在し、人体への安全性がある程度担保されている形態異常誘導遺伝子を使用する。しかも、このベクターを用いて植物への遺伝子導入を行えば、遺伝子導入組織はその形態を指標として容易に選抜することができる。すなわち、遺伝子導入操作後の組織を適当な条件で培養し、その培養中に生じてくる、異常な形態をした組織を検出し、これを選抜してやればよい。培養中に、植物細胞活性を低下させる阻害物質を培地に添加する必要もない。また、このベクターにおいて脱離能を有するDNA因子を選抜マーカー遺伝子と組合せ、植物への遺伝子導入を行えば、選抜マーカー遺伝子の影響が完全に排除され

た遺伝子導入組織を得ることができる。このような組織の取得も、遺伝子導入の際と同様に、遺伝子導入組織の形態を指標とした選抜を行うだけで、容易にすることができる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、かかるベクターによっても、遺伝子導入組織の選抜効率が悪いという問題点があった。つまり、上記のようにして遺伝子導入操作後の組織を培養し、異常な形態をした組織を選抜しても、その組織が遺伝子導入組織ではない場合が多かったのである。これは、形態異常誘導遺伝子を導入した細胞中で産生される植物ホルモン等が、その周囲の細胞にも移行して影響を与え、その影響を受けた非遺伝子導入細胞からも形態異常を示す組織が分化・増殖してくるためであると考えられる。

【0009】

本発明は、遺伝子導入組織の選抜効率改善、及び、従来の技術を用いて植物への遺伝子導入を行った場合の前記した他の問題点を解決することを目的としてなされたものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子を選抜マーカー遺伝子とすることにより、上記課題が解決されることを見出し、本発明を完成させた。

【0011】

すなわち、本発明の目的は、目的遺伝子、及び選抜マーカー遺伝子として植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子を含むベクターを用いて、植物への遺伝子導入を行うことにより達成される。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0013】



ここで、植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子とは、ジベレリン、エチレン、オーキシン、サイトカイニン等の植物ホルモンの存在を認識するセンサーや、そのセンサーからの情報を伝達していく、一連の情報伝達経路に関わるタンパクをコードする遺伝子を意味する。例えば、現在までに、かかる植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子としてエチレン受容体遺伝子である ETR 1 遺伝子 (C.Chang et al., Science, 262:539, 1993)、サイトカイニン受容体遺伝子であると考えられている CKI 1 遺伝子 (T.Kakimoto, Science, 274:982, 1996) とその変異体 (ex. CKI 2 遺伝子) や GCR 1 遺伝子 (S.Plakidou-Dymock et al., Current Biology, 8:315, 1998) の他、IBC 6 遺伝子及び IBC 7 遺伝子 (I.Brandstatter, J.J.Kieber, The Plant Cell, 10:1009, 1998) 等の存在が報告されている (C.Chang, R.C.Stewart, Plant Physiol., 117:723, 1998)。

#### 【0014】

これらの植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子の中でも CKI 1 遺伝子は、その研究も進んでおり、また、これが導入された植物細胞においてサイトカイニンに対する感受性を向上させ、その結果、特徴的な形態を有し、肉眼での検出が容易で増殖も活発な多芽状の組織を分化させることから、本発明の植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子として有用である。もっとも、本発明においては、植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子であれば、この CKI 1 遺伝子のように形態異常を引起すものでなくとも使用できる。かかる遺伝子が導入された植物細胞では、植物ホルモンに対する感受性が変化するため、例えば、本来なら植物ホルモン無添加の培地では増殖が起こらないような植物細胞も、その細胞自体が本来産生している植物ホルモン（内生植物ホルモン）の影響を受けて活発に増殖したりするようになる。従って、植物ホルモンに対するこのような挙動の相違を指標として、遺伝子導入組織を選抜することができるからである。

#### 【0015】

また、本発明においては、選抜マーカー遺伝子として、植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子と共に植物ホルモン合成系遺伝子を使用してもよい

。ここで、植物ホルモン合成系遺伝子とは、ジベレリン、エチレン、オーキシシン、サイトカイニン等の植物ホルモンの合成系に關与する遺伝子を意味する。かかる植物ホルモン合成系遺伝子としては、例えば、オーキシシン合成系遺伝子として、アグロバクテリウム属の細菌が有する i a a M (tryptophan monooxygenase) 遺伝子 (H. Van Onckelen et al., FEBS Lett., 198:357, 1986) や i a a H (indolacetamide-hydrolase) 遺伝子 (L.S. Thomashow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5071, 1984) の他、植物ではアルデヒドオキシダーゼ遺伝子 (特開平 10-108680) やニトリラーゼ遺伝子 (D. Bartling et al., Enr. J. Biochem., 205:417, 1992) 等の存在が、また、サイトカイニン合成系遺伝子として、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens、以下、A. ツメファシエンスと略す。) の T-DNA 上に存在する i p t 遺伝子 (D. Akiyoshi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5994, 1984) の他、植物では A P R T (adenine phosphoribosyltransferase) 遺伝子 (K.M. Schnorr, Plant J., 9:891, 1996) 等の存在が知られており、更に、ジベレリンやエチレンの合成系遺伝子についても種々の植物等からの単離が報告されている (細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 10 『植物ホルモンのシグナル伝達—生合成から生理機能へ—』、p86-96 及び p138-150 参照)。これらの遺伝子は、いずれも本発明において使用することができる。しかし、中でも i p t 遺伝子は、多くの植物種に導入され、またそれらの植物種において機能することが判明しているので、本発明の植物ホルモン合成系遺伝子としての使用に適している。

## 【0016】

なお、本発明において選抜マーカー遺伝子は、脱離能を有する DNA 因子と組合せて使用してもよい。この場合は、本発明の選抜マーカー遺伝子を脱離能を有する DNA 因子と挙動を一つにする位置に組込み、また、目的遺伝子は脱離能を有する DNA 因子と挙動を一つにしない位置に組込んでベクターを構築する。このように構築されたベクターを用いて植物への遺伝子導入を行うことにより、選抜マーカー遺伝子の影響が完全に排除された遺伝子導入組織を容易に得ることができる。

## 【0017】

ここで脱離能を有するDNA因子とは、これらが存在し、機能する染色体DNA等から、それ自身が脱離し得る能力を有するDNA配列をいう。植物ではこのような因子として、染色体上に存在するトランスポゾンと呼ばれるものが知られており、その構造と働き、そしてその挙動もほぼ判明している。すなわち、トランスポゾンが機能するためには、原則として、その内部にある遺伝子から発現し、それ自身の脱離及び転移を触媒する酵素（転移酵素）と、やはりその内部の末端領域に存在し、この転移酵素が結合し作用するDNA配列という、2つの構成要素が必要とされる。これらの働きにより、トランスポゾンはその存在する染色体上から脱離し、その後、普通はDNA上の新たな位置に転移するが、一定の確率で転移できぬままその機能を失い、消失等する場合も生ずるので、本発明ではこのようなトランスポゾンの転移ミスを利用する。

## 【0018】

ちなみに、トランスポゾンには、このような自律性トランスポゾン、すなわち、転移酵素とDNA結合配列という2つの要素を保持していて、トランスポゾン内部から発現する転移酵素が末端領域に存在するDNA配列に結合して作用することにより、自律的にその存在する染色体上から脱離して転移しうるものの他、非自律性トランスポゾンと呼ばれるタイプもある。この非自律性トランスポゾンとは、転移酵素が結合し作用する末端のDNA配列は保持しているものの、内部にある転移酵素遺伝子に変異が生じており、転移酵素の発現がないため、自律的に染色体上から脱離することができないものをいうが、しかし、非自律性トランスポゾンも、自律性トランスポゾンあるいはこれとは独立して存在する転移酵素遺伝子から転移酵素が供給されると、自律性トランスポゾンと同様の挙動を示すこととなる。

## 【0019】

現在、単離されている自律性トランスポゾンとしては、トウモロコシより単離されたA<sub>c</sub>とS<sub>p</sub>mがあり、詳細な解析がなされている（A.Gieri and H.Saedler, Plant Mol.Biol., 19:39, 1992）。とりわけA<sub>c</sub>は、トウモロコシの染色体中、wx-m7遺伝子座を制限酵素S<sub>a</sub>u3Aで切出すことにより得ることができる（U.Behrens et al., Mol.Gen.Genet., 194:346, 1984）、植物トランスポ

ゾンの中では最も解析の進んでいる自律性トランスポゾンであり、そのDNAシーケンスも既に解明されているので (M.Mueller-Neumann et al., Mol.Gen.Genet., 198:19, 1984) 当業者が容易に取得可能なことから、本発明に使用するDNA因子として相応しい。一方、非自律性トランスポゾンとしては、それぞれ Ac、Spm の内部領域が欠損したものである、Ds や dSpm を始め (H.-P.Doering and P.Starlinger, Ann.Rev.Genet., 20:175, 1986)、トウモロコシ以外にも、キンギョソウ、アサガオ等の多くの植物から単離されている (例えば、Y.Inagaki et al., Plant Cell, 6:375, 1994)。なお、これらのトランスポゾンは、その由来する植物と異なる種類の植物の染色体に導入された場合でも、その能力を発揮して脱離し、転移することが多くの例で知られている (例えば、B.Baker et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 83:4844, 1986)。

【0020】

本発明においては、自律性、非自律性のいずれのトランスポゾンを使用することもできる。非自律性のトランスポゾンをを用いる場合には、その内部に、選抜マーカー遺伝子の他、自律性トランスポゾン等から取得、又は合成した転移酵素遺伝子を挿入して使用すればよい。

【0021】

更に、植物以外に存在する脱離能を有するDNA因子としては、部位特異的組換え系 (site-specific recombination system) に由来するものが知られている。この部位特異的組換え系は、組換え配列と呼ばれる特徴的なDNA配列を有する組換え部位 (本発明の脱離能を有するDNA因子にあたる。)、及びこの組換え配列に特異的に結合して、その配列が2つ以上存在したとき、その配列間の組換えを触媒する酵素 (組換え酵素)、という2つの要素からなっている。そして、このDNA配列が同一DNA分子上に、同一方向を向いてある一定の間隔で二つ存在している場合には、これに挟まれた領域がこのDNA分子 (プラスミド、染色体等) から脱離し、また、この配列が対向する方向を向いて二つ存在している場合には、この領域が反転する、という挙動を示す。本発明では、この前者の脱離作用を利用するが、このような組換え部位内部の脱離・反転は、部位特異的組換え系によるいわゆる相対的組換えの結果として生ずるものであり、これが、

転移の過程としてその脱離を起こす、トランスポゾンを用いた場合の機構と最も異なる点である。なお組換え酵素をコードする遺伝子は、必ず組換え部位と同一のDNA分子上に存在する必要はなく、これと同一細胞内に存在し、発現してさえすれば、このDNA配列間の脱離・反転を生ぜしめ得ることが知られている(N.L.Craig, Annu.Rev.Genet., 22:77, 1988)。

## 【0022】

現在、部位特異的組換え系はファージ、細菌(例えば大腸菌)、酵母等の微生物から分離されたCre/lox系、R/R<sub>S</sub>系、FLP系、cer系、fim系等が知られているが(総説として、N.L.Craig, Annu.Rev.Genet., 22:17, 1988)、高等生物ではまだその存在を知られていない。しかし、これらの微生物から分離された部位特異的組換え系も、その由来する生物種と異なる生物種(植物を含む)に導入された場合に、そのそもそもの生物内における挙動と同一の挙動をとることが明らかとなっている。ちなみに本発明の実施例では、酵母(Zygosaccharomyces rouxii)の部位特異的組換え系であるR/R<sub>S</sub>系(H.Matsuzaki et al., J.Bacteriology, 172:610, 1990)を、その組換え部位に組換え酵素を挿入して利用したが、このR/R<sub>S</sub>系もまた、高等植物においてその本来の機能を維持することが既に報告されている(H.Onouchi et al, Nucleic Acid Res., 19:6373, 1991)。

## 【0023】

また、本発明において、選抜マーカー遺伝子を挿入する場所は、脱離能を有するDNA因子と共に、これが脱離し得る位置でありさえすればよい。例えば、脱離能を有するDNA因子としてトランスポゾンを用いた場合には、転移酵素遺伝子のプロモーター領域より上流で、この転移酵素が結合する末端領域よりは下流の、トランスポゾンの脱離に影響を及ぼさない位置にこれを挿入することができる。一方、R/R<sub>S</sub>系を用いた場合には、組換え部位の領域内で、組換え酵素の発現を阻害しない位置でありさえすれば、これをどこにでも挿入することができる。

## 【0024】

本発明のベクターは、遺伝子工学的手法により遺伝子導入が可能な、いかなる

植物に対しても用いることができる。また、本発明のベクターにより植物に導入できる目的遺伝子は、農業的に優れた形質を付与できる遺伝子、農業的に優れた形質を付与するとは限らないが、遺伝子発現機構の研究に必要とされる遺伝子等、目的に応じて種々選択することができる。

# 【0025】

なお一般に、遺伝子から酵素等のタンパクが産生されるには、これらポリペプチドの情報をコードしている構造遺伝子配列の他に、構造遺伝子のプロモーター（発現開始配列）、ターミネーター（発現終結配列）などの調節配列が必要とされ、通常、単に遺伝子とした場合には、これらの調節配列を備えた構造遺伝子のことを言う。本発明においては、その植物においてそれが機能する限り、こうしたプロモーター及びターミネーターを制限なく使用できる。例えば、プロモーターとしては、カリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーター（J.T.Odell et al., Nature (London), 313:810, 1985）、ノパリン合成酵素のプロモーター（W.H.R.Langridge et al., Plant Cell Rep., 4:355, 1985）の他、化学物質誘導型のプロモーターである、グルタチオン-S-トランスフェラーゼI系遺伝子のプロモーター（特開平5-268965）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼII系（GST-II）遺伝子のプロモーター（国際公開W093/01294号公報）、Tetリプレッサー融合型カリフラワーモザイクウィルス35Sプロモーター（C.Gatz et al., Mol.Gen.Genet., 227:229, 1991）、Lacオペレーター／リプレッサー系プロモーター（R.Wilde et al., The EMBO Journal, 11:1251, 1992）、alcR/alcA系プロモーター（国際公開W094/03619号公報）、グルココルチコイド系プロモーター（青山卓史、蛋白質 核酸 酵素、41:2559, 1996）、par系プロモーター（T.Sakai et al., Plant Cell Physiol., 37:906, 1996）等、熱誘導型のプロモーターであるhsp80プロモーター（特開平5-276951）等、光誘導型のプロモーターであるリブ羅斯2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット（rbcs）遺伝子のプロモーター（R.Fluhr et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 83:2358, 1986）、フルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ遺伝子のプロモーター（特表平7-501921号公報）、集光性クロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子のプロモーター（特開平5-89）等、種

々の誘導型のプロモーターを使用することができ、一方、ターミネーター配列としては、ノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナル (A. Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen., 1:561, 1982)、オクトピン合成酵素のポリアデニル化シグナル (J. Gielen et al., EMBO J., 3:835, 1984) 等を使用することができる。

【0026】

本発明において使用する遺伝子は、cDNA又はゲノムDNAのクローニングにより得ることができる。また、あらかじめそのシーケンスが明らかにされているものであれば、これを化学合成して得てもよい。

【0027】

本発明のベクターの植物細胞への導入は、植物に感染するウイルスや細菌を介して間接的に行うことも、物理的・化学的手法によって直接的に行うこともできる (I. Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42:205, 1991)。例えば、前者による方法においては、カリフラワーモザイクウイルス、ジェミニウイルス、タバコモザイクウイルス、ブロムモザイクウイルス、A. ツメファシエンス、アグロバクテリウム・リゾジェネス等による感染を利用することができ、また、後者による方法においては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、細胞融合法、高速バリスティックベネトレーション法等を適用することができる。

【0028】

【作用】

本発明において、選抜マーカー遺伝子として用いた植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子は、これが発現することにより、その導入された植物細胞において植物ホルモンに対する感受性を変化させるため、植物ホルモン（内生であるか外生であるかを問わない。）の存在下、その細胞内の生理状態に異常をもたらす、結果としてこれら植物細胞の増殖・分化の方向を狂わせ、通常とは異なる挙動を引起す。従って、かかる植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子を選抜マーカー遺伝子として目的遺伝子と共にベクターを構築し、このベクターを植物細胞に導入すれば、培養中に観察されるその細胞の異常な挙動を指標として、選抜マーカー遺伝子、つまりは目的遺伝子が導入された細胞だけから

なる組織を選抜できることとなる。選抜のため、植物細胞活性を低下させる植物細胞成長阻害物質を使用する必要はない。

【0029】

しかも、この植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子を選抜マーカー遺伝子として用いた場合には、その遺伝子産物が遺伝子導入細胞から周囲の非遺伝子導入細胞に移行して、その影響をこれらの細胞に及ぼすようなことはない。例えば、ある細胞にサイトカイニンシグナルトランスダクション系遺伝子である CKI1 遺伝子が導入され、サイトカイニンに対する感受性が向上したとしても、その影響が周囲の非遺伝子導入細胞に及ぶことはなく、それらの細胞のサイトカイニン感受性が向上することはない。従って、CKI1 遺伝子の影響による多芽状の組織を形成するのは遺伝子導入細胞のみであり、遺伝子導入操作後の細胞を培養し、この多芽状の組織の形成を指標として選抜すれば、それは、遺伝子導入細胞に由来する組織、すなわち遺伝子導入組織である。このため、本発明においては、遺伝子導入組織の選抜効率を大きく改善することができる。

【0030】

また、植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子、及び、本発明の選抜マーカー遺伝子として、この植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子と共に必要に応じて用いられる植物ホルモン合成系遺伝子は、いずれも、植物が本来保持しているか、あるいは細菌等の感染により植物に自然に導入されてきた遺伝子である。従って、その遺伝子産物の人体への安全性に対してはかなり信頼できると考えられる。

【0031】

更に本発明では、このような選抜マーカー遺伝子を、脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に組込んで使用することもできる。かかる構成を有するベクターを用いて植物に遺伝子を導入すれば、導入後、選抜マーカー遺伝子は、このDNA因子と共に、それらが導入され機能していたDNA上から、一定の確率で脱離してその機能を失う一方、これとは挙動を一つにしない目的遺伝子は同じDNA上に残留して機能を保持し続ける、つまり、目的遺伝子のみが発現可能に導入されている細胞が得られることになる。



## 【0032】

加えて、この選抜マーカー遺伝子の機能の消失は、遺伝子導入の際と同様に、培養されている遺伝子導入組織の挙動の変化として検出できることから、選抜マーカー遺伝子の機能の消失した細胞だけからなる組織、換言すれば、目的遺伝子のみが発現可能に導入されている細胞だけからなる組織は、培養組織の段階で确实・容易に選抜できることとなる。すなわち、かかる細胞だけからなる組織を得るためには、まず、遺伝子導入操作後の細胞を培養して、選抜マーカー遺伝子である植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子の発現により引起される挙動の異常を指標として遺伝子導入組織を選抜し、これを分離する。そして、その分離した組織の培養中に、異常な挙動を示す組織から、今度は、そのそもそもの組織が示していた正常な挙動を示す組織が生じてくるので、これをやはり選抜すればよい。

## 【0033】

## 【実施例】

以下に、本発明を実施例に基づいて説明する。なお、以下の実施例において、更に詳細な実験操作は、特に述べる場合を除き、モレキュラー・クローニング第2版 (Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989)、又は製造業者の取扱い説明書に従い行われた。

## 【0034】

## [実施例1]

I. プラスミド pIPTPCKI-4 の作成

プラスミド pB1221 (東洋紡績 (株) より購入) より GUS 遺伝子を制限酵素 SacI と EcoRI にて切出し、その切断末端を T4 ポリメラーゼにより平滑化した後、プラスミド pHSG398 (宝酒造 (株) より購入) の HincII 制限酵素部位に挿入してプラスミド pNOST を得た。

## 【0035】

一方、病原性 A. ツメファシエンス PO22 株の ipt 遺伝子を有するプラスミド pIPT2 (特開平 9-154580) を鋳型として、PCR 法により ipt 遺伝子のプロモーターを増幅した (プライマーとして、5'-AGCGGAT

AACAATTTTCACACAGGAAAC-3' と 5'-AGTTTTTTTGCGGTATCTTGAATACAA-3' を組合せて使用。)。この i p t 遺伝子のプロモーターをプラスミド pUC18 (宝酒造 (株) より購入) の SmaI 制限酵素部位に挿入してプラスミド pIPT/Ap を得、更に、この pIPT/Ap に挿入された i p t 遺伝子のプロモーターを制限酵素 EcoRI と HindIII を用いて切出し、これを pHSG398 の EcoRI-HindIII 制限酵素部位間に挿入して、プラスミド pIPTP/Cm を得た。

## 【0036】

次いで、得られた pIPTP/Cm を制限酵素 KpnI と SalI にて切断することにより、i p t 遺伝子のプロモーターを再度切出し、これをプラスミド pCKI16R1-2 (大阪大学大学院理学研究科 柿本氏より譲渡) の KpnI-XhoI 制限酵素部位間に挿入してプラスミド pIPTPCKI-1 を得、このプラスミドから、i p t 遺伝子のプロモーターとこれに連結された CKI1 構造遺伝子を制限酵素 KpnI と SpeI で切出して、pNOST の KpnI-XbaI 制限酵素部位間に挿入し、プラスミド pIPTPCKI-2 を得た。

## 【0037】

目的とするプラスミドは、この pIPTPCKI-2 から i p t 遺伝子のプロモーターとノバリン合成酵素のポリアデニル化シグナルとが連結された CKI1 構造遺伝子を制限酵素 KpnI と SseI にて切出し、これをプラスミド pIPT20 (特願平10-202335) の KpnI-SseI 制限酵素部位間の rbcs プロモーター及びこれに連結された i p t 遺伝子と置換するように挿入して得られ、これを pIPTPCKI-4 と命名した。

## 【0038】

なお、このプラスミド pIPTPCKI-4 は、大腸菌 (Escherichia coli) JM109 株に導入し、この大腸菌を E. coli JM109 (pIPTPCKI-4) として、国際寄託に付した (受託番号: FERM BP-6952号)。

## 【0039】

pIPTPCKI-4 の作成スキムを図1~5に、また、この pIPTPCK

I-4において植物染色体中に組込まれることとなる領域(T-DNA領域)の制限酵素地図を図6に示す。図6中、NOS-Pはノパリン合成酵素のプロモーター、Tは同じくノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナル、ipt-Pは*ipt*遺伝子のプロモーター、35S-Pはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーター、GUSは $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を表しており、小さな黒三角形はそれぞれT-DNA領域を画するRBサイトとLBサイトを示している。

#### 【0040】

図6より明らかなように、このプラスミドは、植物染色体に組込まれることとなる領域内に、選抜マーカー遺伝子として植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子であるCKI1遺伝子を、目的遺伝子のモデルとしてNPTII遺伝子及びGUS遺伝子を有している。このNPTII遺伝子は、前記した通りカナマイシン抵抗性に寄与する遺伝子として、GUS遺伝子はこれを有する細胞が特殊な基質を代謝して青色の色素を生産することから、ともに植物における遺伝子発現の解析に汎用されている遺伝子である。

#### 【0041】

##### II. アグロバクテリウムへのpIPTPCKI-4の導入

A. ツメファシエンスEHA105株を、10mlのYEB液体培地(ビーフエキス5g/l、酵母エキス1g/l、ペプトン1g/l、ショ糖5g/l、2mM MgSO<sub>4</sub>、22℃でのpH7.2(以下、特に示さない場合は、22℃でのpHとする。))に接種し、OD<sub>630</sub>が0.4から0.6の範囲に至るまで、28℃で培養した。培養液を6900×g、4℃、10分間遠心して集菌した後、菌体を20mlの緩衝液(10%グリセロール、1mM HEPES、pH7.0)に懸濁して、再度6900×g、4℃、10分間の遠心で集菌し、次いでこの菌体を200μlのYEB液体培地に懸濁して、これをプラスミド導入用菌液とした。

#### 【0042】

アグロバクテリウムへのプラスミドpIPTPCKI-4の導入は、エレクトロポレーション法にて行った。すなわち、Iで作成したpIPTPCKI-4

3  $\mu$ gを混合したプラスミド導入用菌液50  $\mu$ lに対し、電極間距離0.2 cmにて2.5 kV、25  $\mu$ F、200  $\Omega$ の電気パルスを付与することにより、pIPTPCKI-4をアグロバクテリウムに導入した（バイオラッド社製 GENEPULSER IIを使用。）。エレクトロポレーション操作後の菌体は、200  $\mu$ lのYEB液体培地を加えて25℃、1時間振とう培養した後、50 mg/lカナマイシン添加YEB寒天培地（寒天1.5 w/v%）に播種し、28度で2日間培養することによりpIPTPCKI-4導入株を選抜した。pIPTPCKI-4導入の最終的な確認は、選抜された株よりアルカリ法で抽出したプラスミドを制限酵素にて切断し、その切断断片の電気泳動パターンを比較することで行った。

#### 【0043】

#### III. アグロバクテリウムからシロイヌナズナへのpIPTPCKI-4の導入及び遺伝子導入シロイヌナズナの解析

定法（細胞工学別冊 植物工学シリーズ4 『モデル植物の実験プロトコールーイネ・シロイヌナズナ編ー』、p138-139参照）に従い、カルス化させたシロイヌナズナについてIIで得られたpIPTPCKI-4導入A. ツメファシエンスの感染処理を行った。感染処理後のシロイヌナズナカルスは、植物ホルモンとしてオーキシンであるインドール酪酸を0.5 mg/l、抗生物質としてセフトキシムを150 mg/l添加したムラシゲ・スケーグ（MS）培地（T. Murashige and F. Skoog, *Physiol. Plant.*, 15:473, 1962、他の成分としてショ糖1 w/v%、寒天0.8 w/v%を添加。）に置床し、23℃、5000 luxにて培養したところ、感染処理から20日後には、実験に供したカルス40個のうち21個から多芽状の芽の分化が観察されたので、これらの芽につきJeffersonらの方法に準拠してGUS活性試験を行い、その全てにおいてGUS活性を検出した。

#### 【0044】

本来、シロイヌナズナカルスから芽を分化させるには、このカルスに、植物ホルモンであるサイトカイニンを外から供給してやる必要がある。そのため、このカルスを培養する培地中にはサイトカイニンが添加される。しかし、本実験で

は、サイトカイニン無添加の培地で培養したカルスのうち、50%以上から多芽状の芽の分化が観察された。これは、これらのカルスを構成する細胞にCKI 1遺伝子が導入されたため、その細胞のサイトカイニン感受性が向上した結果、細胞自体が本来産生している内生のサイトカイニンの影響が、その細胞に異常に大きく作用したためであると考えられる。また、こうして選抜マーカー遺伝子であるCKI 1遺伝子の働きにより生じた、多芽状の形態を指標として選抜した組織からは、例外なく目的遺伝子であるGUS遺伝子の活性が検出された。すなわち、本実験において、遺伝子導入組織の選抜効率は100%であった。

【0045】

## 〔実施例2〕

### I. プラスミドpIPCK-1の作成

実施例1のIで得られたプラスミドpIPTPCKI-2を制限酵素Sse Iでいったん切断し、T4ポリメラーゼにより切断末端を平滑化した後、その切断部位にKpnIリンカーを挿入してプラスミドpIPTPCKI-3を得た。得られたpIPTPCKI-3より、ipt遺伝子のプロモーターとノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナルとが連結されたCKI 1構造遺伝子を制限酵素Kpn Iにて切出して、これをプラスミドpIPT20のKpn I制限酵素部位に挿入し、目的とするプラスミドpIPCK-1を得た。

【0046】

なお、このプラスミドpIPCK-1は、大腸菌JM109株に導入し、この大腸菌をE. coli JM109 (pIPCK-1)として、国際寄託に付した(受託番号:FERM BP-6951号)。

【0047】

pIPCK-1の作成スキムを図7に、また、このpIPCK-1において植物染色体中に組込まれることとなる領域を図8に示す。図8中、丸で囲んだTはipt遺伝子自身のポリアデニル化シグナル、rbc-Pはrbc S遺伝子のプロモーターを示している。他の記号は図6で用いているものと同様である。

【0048】

図8より明らかなように、このプラスミドは、植物染色体に組込まれることに

なる領域内に、選抜マーカー遺伝子として植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子である CKI 1 遺伝子と植物ホルモン合成系遺伝子である i p t 遺伝子を有している。目的遺伝子に関する構成はプラスミド p I P T P C K I - 4 と同様である。

【0049】

# II. p I P C K - 1 のシロイヌナズナへの導入及び遺伝子導入シロイヌナズナの解析

実施例 1 の II、III と同様にして、プラスミド p I P C K - 1 導入 A. ツメファシエンス E H A 1 0 5 株をシロイヌナズナカルスに感染させ、このカルスを培養した。その結果、A. ツメファシエンス感染後 2 0 日目には、実験に供したカルス 4 0 個のうち 1 7 個から、p I P T P C K I - 4 を導入した場合と比較して、よりコンパクトな多芽状を示す芽の分化が観察されたので、これらの芽につき G U S 活性試験を行い、その全てにおいて G U S 活性を検出した。

【0050】

なお、ここで p I P C K - 1 導入処理を行ったカルスから分化してきた芽は、実施例 1 で観察されたものとはやや異なった形態を示した。これは、p I P C K - 1 が導入された細胞において、CKI 1 遺伝子の働きによりサイトカイニン感受性が向上したところに、その細胞が本来産生している内生サイトカイニンに加え、CKI 1 遺伝子と共に導入された i p t 遺伝子の働きにより産生するサイトカイニンまで供給されたことが、何らかの影響を及ぼしているものと考えられる。

【0051】

## [比較例 1]

植物への遺伝子導入用ベクタープラスミド p B I 1 2 1 (東洋紡績(株)より購入。)を実施例 1 の II、III と同様にしてシロイヌナズナカルスに導入し、このカルスを培養したが、A. ツメファシエンス感染から 2 0 日を経過しても、実験に供した 3 0 個のカルスから芽の分化は観察されなかった。なお、本比較例のように、この p B I 1 2 1 がただ単に植物細胞に導入された場合は、N P T I I 遺伝子と G U S 遺伝子のみが植物染色体に組込まれることとなる。

【0052】

## 〔比較例2〕

目的遺伝子のモデルとしてGUS遺伝子、及び、選抜マーカー遺伝子としてCaMV35Sプロモーターの制御下におかれた*i p t*構造遺伝子を有するプラスミドpIPT5（図9）を、実施例1のII、IIIと同様にしてシロイヌナズナカルスに導入し、このカルスを培養した。その結果、実験に供したカルス40個のうち7個から、*i p t*遺伝子の影響によると考えられる頂芽優勢が崩れた芽の分化が観察されたが、これらの芽についてGUS活性試験を行ったところ、GUS活性が検出されたのは1個のみであった。

【0053】

## 〔比較例3〕

目的遺伝子のモデルとしてGUS遺伝子、及び、選抜マーカー遺伝子としてその本来のプロモーターの制御下におかれた*i p t*遺伝子を有するプラスミドpIPT10（図10）を、実施例1のII、IIIと同様にしてシロイヌナズナカルスに導入し、このカルスを培養した。その結果、実験に供したカルス40個のうち2個から、比較例2と同様に頂芽優勢の崩れた芽の分化が観察されたが、これらの芽についてGUS活性試験を行ったところ、いずれの芽からもGUS活性は検出されなかった。

【0054】

## 〔実施例3〕

## I. プラスミドpMATCK-1の作成

プラスミドpNPI128（特開平9-154580）より、SmaI及びXbaI制限酵素部位を欠失させるため、このプラスミドを制限酵素KpnIでいったん切断し、T4ポリメラーゼによりその切断末端を平滑化した後、再結合した。更に、こうして得られたプラスミドpNPI128-1を制限酵素XhoIで切断し、再びT4ポリメラーゼにより切断末端を平滑化した後、その切断部位にKpnIリンカーを挿入してプラスミドpNPI128-2を得、このpNPI128-2のEcoRI制限酵素部位に、プラスミドpNPI301（特願平9-118938）より制限酵素EcoRIにて切出したGST-II遺伝子の

プロモーターとノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナルとが連結された R 構造遺伝子を挿入して、プラスミド pGSTR128 を得た。なお、ここで用いた R 構造遺伝子とは、酵母の部位特異的組換え系より分離された組換え酵素をコードする遺伝子である。

## 【0055】

一方、実施例 2 の I で得られたプラスミド pIPTPCKI-3 より、i p t 遺伝子のプロモーターとノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナルとが連結された CKI 1 構造遺伝子を制限酵素 K p n I で切出してプラスミド pUC18 (宝酒造 (株) より購入。) の K p n I 制限酵素部位に挿入し、プラスミド pIPTPCKI-3/Ap を得た。次いで、この pIPTPCKI-3/Ap より、再び i p t 遺伝子のプロモーター、CKI 1 構造遺伝子及びノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナルを制限酵素 K p n I で切出し、pGSTR128 の K p n I 制限酵素部位に挿入して、プラスミド pGSTRCKI128 を得た。

## 【0056】

目的とするプラスミドは、この pGSTRCKI128 より、酵母の部位特異的組換え系の組換え配列 R s に挟まれた領域を制限酵素 S s e I で切出して、プラスミド pBI121 の S s e I 制限酵素部位に挿入することにより得られ、これをプラスミド pMATCK-1 と命名した。

## 【0057】

なお、このプラスミド pMATCK-1 は、大腸菌 JM109 株に導入し、この大腸菌を *E. coli* JM109 (pMATCK-1) として、国際寄託に付した (受託番号: FERM BP-6953 号)。

## 【0058】

pMATCK-1 の作成スキムを図 11~14 に、また、この pMATCK-1 において植物染色体中に組込まれることとなる領域 (T-DNA 領域) の制限酵素地図を図 14 に示す。図 14 中、GST-P は GST-II 遺伝子のプロモーター、また、矩形で囲まれた三角形は組換え配列 R s とその配列方向を表しており、他の記号は図 6 で用いたものと同様の意味を示している。

## 【0059】



図14より明らかなように、この pMATCK-1 は、植物染色体に組込まれることになる領域に、選抜マーカー遺伝子として植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子である CKI1 遺伝子を、目的遺伝子のモデルとして NPTII 遺伝子及び GUS 遺伝子を有する点では、実施例1の I で作成したプラスミド pIPTPCKI-4 と同様であるが、酵母の部位特異的組換え系の組換え酵素遺伝子 (R 遺伝子) と組換え配列とを有し、また、選抜マーカー遺伝子である CKI1 遺伝子とその組換え配列に挟まれた領域に存在している点で異なっている。それ故、このベクターを用いて植物への遺伝子導入を行った場合、いったん植物染色体に組込まれた選抜マーカー遺伝子は、組換え酵素の発現により、この組換え酵素及び組換え配列と共に脱離し、一方、目的遺伝子はそのままだま染色体上に残留して機能し続けることとなる。

【0060】

#### II. pMATCK-1 のシロイヌナズナへの導入及び遺伝子導入シロイヌナズナの解析

実施例1の II、III と同様にして、プラスミド pMATCK-1 導入 A. ツメファシエンス EHA105 株をシロイヌナズナカルスに感染させ、このカルスを培養した。その結果、A. ツメファシエンス感染後20日目には、実験に供したカルス30個の全てから、pIPTPCKI-4 を導入した場合と同様の多芽状を示す芽の分化が観察されたので、これらの芽の中、異なるカルスから分化してきた17個の芽について GUS 活性試験を行い、その全てにおいて GUS 活性を確認した。

【0061】

なお、このようにして GUS 活性が検出された17個の芽について、CTAB 法により染色体 DNA を抽出し、NPTII 遺伝子と GUS 遺伝子にそれぞれ結合するよう設計された、2種のプライマーを用いて PCR を行ない、増幅 DNA 断片を電気泳動により分析したところ、2個の芽において、CKI1 遺伝子と R 遺伝子の消失が検出された (PCR 条件及び電気泳動条件は、特開平7-313432に記載の条件に準じた。)。これは、R 遺伝子のプロモーターとして用いた GST-II 遺伝子のプロモーターの活性が、本実験を行なった際、植物組織

に加えられた障害に起因する細胞内の生理的变化によって誘導され、その結果R遺伝子が発現して、部位特異的組換え系の組換え配列Rsに挟まれた領域が脱離したためと考えられる。また、これら2個の芽においては、その形態の異常を引起すCKI1遺伝子の染色体からの脱離が検出されたにもかかわらず、同時に分析を行なった、CKI1遺伝子を染色体上に保持している他の15個の芽と比べて、さして顕著な形態の相違が検出されなかったが、これは、その培養期間がA. ツメファシエンスの感染後20日間と極めて短かったためであり、両者において、肉眼で検出できるような形態の相違が生ずるまでに到らなかったものと考えられる。

【0062】

〔実施例4〕

I. プラスミドpMATIPCK-1の作成

プラスミドpRB4（特願平10-202335）より、rbcSプロモーターとこれに連結されたipt遺伝子を制限酵素EcoRI及びHindIIIにて切出し、実施例3のIで得られたプラスミドpNPI128-2のEcoRI-HindIII制限酵素部位間に挿入してプラスミドpRBCIPT128を得、次いで、このpRBCIPT128のHindIII制限酵素部位に、プラスミドpGSR2（特願平10-202335）から制限酵素HindIIIにて切出した、GST-II遺伝子のプロモーターとノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナルとが連結されたR構造遺伝子を挿入して、プラスミドpGSTR IPT128を得た。

【0063】

一方、実施例3のIで得られたプラスミドpIPTPCKI-3/Apより、ipt遺伝子のプロモーターとノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナルとが連結されたCKI1構造遺伝子を制限酵素KpnIで切出した。そして、その切断末端をT4ポリメラーゼにより平滑化した後、pGSTR IPT128のSmaI制限酵素部位に挿入して、プラスミドpGSTRCKI IPT128を得た。

【0064】

目的とするプラスミドは、この pGSTRCKIIPT128 より、酵母の部位特異的組換え系の組換え配列 R s に挟まれた領域を制限酵素 S s e I で切出して、プラスミド pBI121 の S s e I 制限酵素部位に挿入することにより得られ、これをプラスミド pMATIPCK-1 と命名した。

#### 【0065】

なお、このプラスミド pMATIPCK-1 は、大腸菌 JM109 株に導入し、この大腸菌を E. coli JM109 (pMATIPCK-1) として、国際寄託に付した (受託番号: FERM BP-6954 号)。

#### 【0066】

pMATIPCK-1 の作成スキムを図 15~18 に、また、この pMATIPCK-1 において植物染色体中に組込まれることとなる領域 (T-DNA 領域) の制限酵素地図を図 18 に示す。図 18 中の記号は図 6、8、14 で用いたものと同様の意味を示している。

#### 【0067】

図 18 より明らかなように、この pMATIPCK-1 は、植物染色体に組込まれることになる領域に、選抜マーカー遺伝子として植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子である CKI1 遺伝子及び植物ホルモン合成系遺伝子である i p t 遺伝子を、目的遺伝子のモデルとして NPTII 遺伝子及び GUS 遺伝子を有する点では、実施例 2 の I で作成したプラスミド pIPCK-1 と同様であるが、酵母の部位特異的組換え系の組換え酵素遺伝子 (R 遺伝子) と組換え配列とを有し、また、選抜マーカー遺伝子である CKI1 遺伝子及び i p t 遺伝子とその組換え配列に挟まれた領域に存在している点で異なっている。従って、このベクターにおいて選抜マーカー遺伝子は、実施例 3 の I で作成したプラスミド pMATCK-1 における場合と同様の挙動をとることとなる。

#### 【0068】

II. pMATIPCK-1 のシロイヌナズナへの導入及び遺伝子導入シロイヌナズナの解析

実施例 1 の II、III と同様にして、プラスミド pMATIPCK-1 導入 A. ツメファシエンス EHA105 株をシロイヌナズナカルスに感染させ、この

カルスを培養した。その結果、A. ツメファシエンス感染後20日目には、実験に供したカルス30個の全てから、pIPTCKI-4を導入した場合と比較して、よりコンパクトな多芽状を示す芽の分化が観察されたので、これらの芽の中、異なるカルスから得られた7個の芽についてGUS活性試験を行い、その全てにおいてGUS活性を確認した。

【0069】

【発明の効果】

本発明のベクターは、選抜マーカー遺伝子として、植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子又は植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子と植物ホルモン合成系遺伝子を使用したものである。このため、これを用いて植物への遺伝子導入を行った場合、植物細胞活性を低下させる植物細胞成長阻害物質を使用することなく、選抜マーカー遺伝子の効果により引起される植物細胞の異常な挙動を指標として、目的遺伝子導入組織を高い効率で選抜することができる。また、植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子として、特にCKI1遺伝子を用いた場合には、これが導入された植物細胞は、肉眼で容易に識別できる特徴的な形態をした組織を分化させ、しかも、この組織は植物ホルモン無添加の培地においても活発に増殖するので、遺伝子導入組織の選抜・培養上、非常に都合が良い。

【0070】

更に、植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子及び植物ホルモン合成系遺伝子は、植物が本来保持しているか、あるいは細菌等の感染により植物に自然に導入されてきた遺伝子であるため、これらの遺伝子が遺伝子導入を行った植物細胞内で発現していても、これを食用等に供した場合の人体への安全性に対しては、かなり信頼することができる。

【0071】

加えて、このベクターにおいて、脱離能を有するDNA因子をその構成に加え、選抜マーカー遺伝子をこの脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に組込めば、選抜マーカー遺伝子は、植物細胞への遺伝子導入後に一定の確率で、かかるDNA因子と共に、それらが導入され機能していたDNA上から脱離し

てその機能を失い、同時に導入された、これとは挙動を一つにしない位置に存在する目的遺伝子のみが、同じDNA上に発現可能な状態で残留することとなる。このため、このような構成をとった場合、このベクターは、導入しようとする目的遺伝子に関する部分を変更するのみで、選抜マーカー遺伝子を始めとする他の構成に何らの変更をも加えることなく、ある一つの植物体へ遺伝子の多重導入を行うために、何度でも無制限に繰り返して用いることができる。

【0072】

そしてこの場合も、選抜マーカー遺伝子の機能の消失は、遺伝子導入の際と同様に、遺伝子導入組織の挙動の変化として検出できるので、目的遺伝子のみが染色体等に残留してその機能を保持している細胞だけからなる組織を、培養組織の段階で確実・容易に選抜できることとなる。従って、遺伝子の多重導入も効率良く行え、また、かかる細胞だけからなる遺伝子導入個体、すなわち選抜マーカー遺伝子の影響が排除され、その遺伝子産物がもたらす危惧から完全に解放された植物個体も、交配過程を経ることなく得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

pIPTPCKI-4 作成スキムのうち、pNOSTの作成までを示す図である。

【図2】

pIPTPCKI-4 作成スキムのうち、pIPTP/ApからpIPTP/Cmの作成までを示す図である。

【図3】

pIPTPCKI-4 作成スキムのうち、pIPTP/CmからpIPTPCKI-1の作成までを示す図である。

【図4】

pIPTPCKI-4 作成スキムのうち、pIPTPCKI-1からpIPTPCKI-2の作成までを示す図である。

【図5】

pIPTPCKI-4 作成スキムのうち、pIPTPCKI-2からpIPT

PCKI-4の作成までを示す図である。

【図 6】

pIPTPCKI-4の構造のうち、T-DNA領域の制限酵素地図である。

【図 7】

pIPCK-1作成スキムを示す図である。

【図 8】

pIPCK-1の構造のうち、T-DNA領域の制限酵素地図である。

【図 9】

pIPT5の構造のうち、T-DNA領域の制限酵素地図である。

【図 10】

pIPT10の構造のうち、T-DNA領域の制限酵素地図である。

【図 11】

pMATCK-1作成スキムのうち、pNPI128-2の作成までを示す図である。

【図 12】

pMATCK-1作成スキムのうち、pNPI128-2からpGSTR128の作成までを示す図である。

【図 13】

pMATCK-1作成スキムのうち、pIPTPCKI-3及びpGSTR128からpGSTRCKI128の作成までを示す図である。

【図 14】

pMATCK-1作成スキムのうち、pGSTRCKI128からpMATCK-1の作成まで、及び、作成されたpMATCK-1の構造を示す図である。

【図 15】

pMATIPCK-1作成スキムのうち、pRBCIPT128の作成までを示す図である。

【図 16】

pMATIPCK-1作成スキムのうち、pRBCIPT128からpGSTRIPT128の作成までを示す図である。

【図 17】

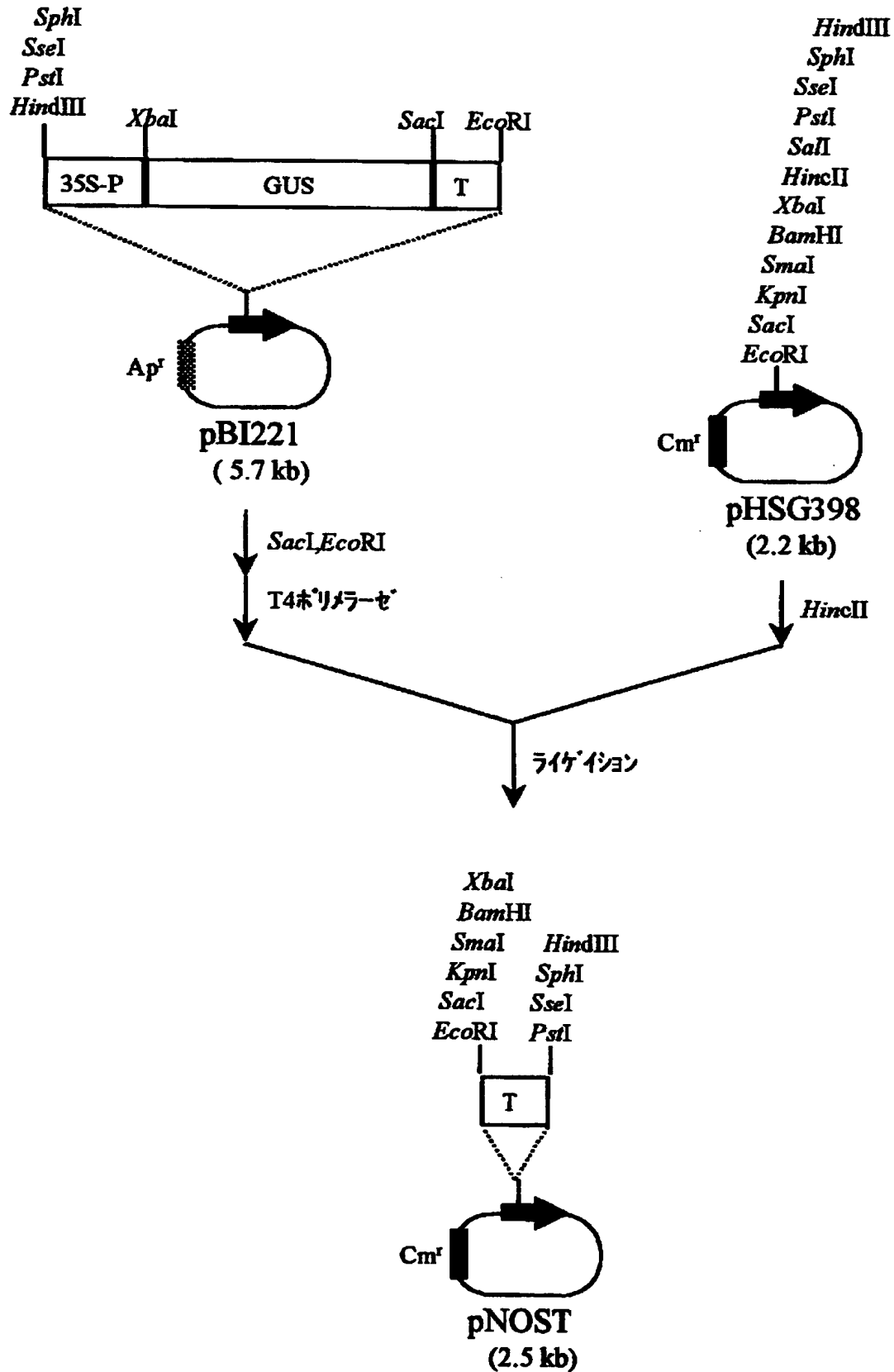
pMATIPCK-1 作成スキムのうち、pIPTPCKI-3/Ap 及び pGSTR IPT128 から pGSTRCKI IPT128 の作成までを示す図である。

【図 18】

pMATIPCK-1 作成スキムのうち、pGSTRCKI IPT128 から pMATIPCK-1 の作成まで、及び、作成された pMATIPCK-1 の構造を示す図である。

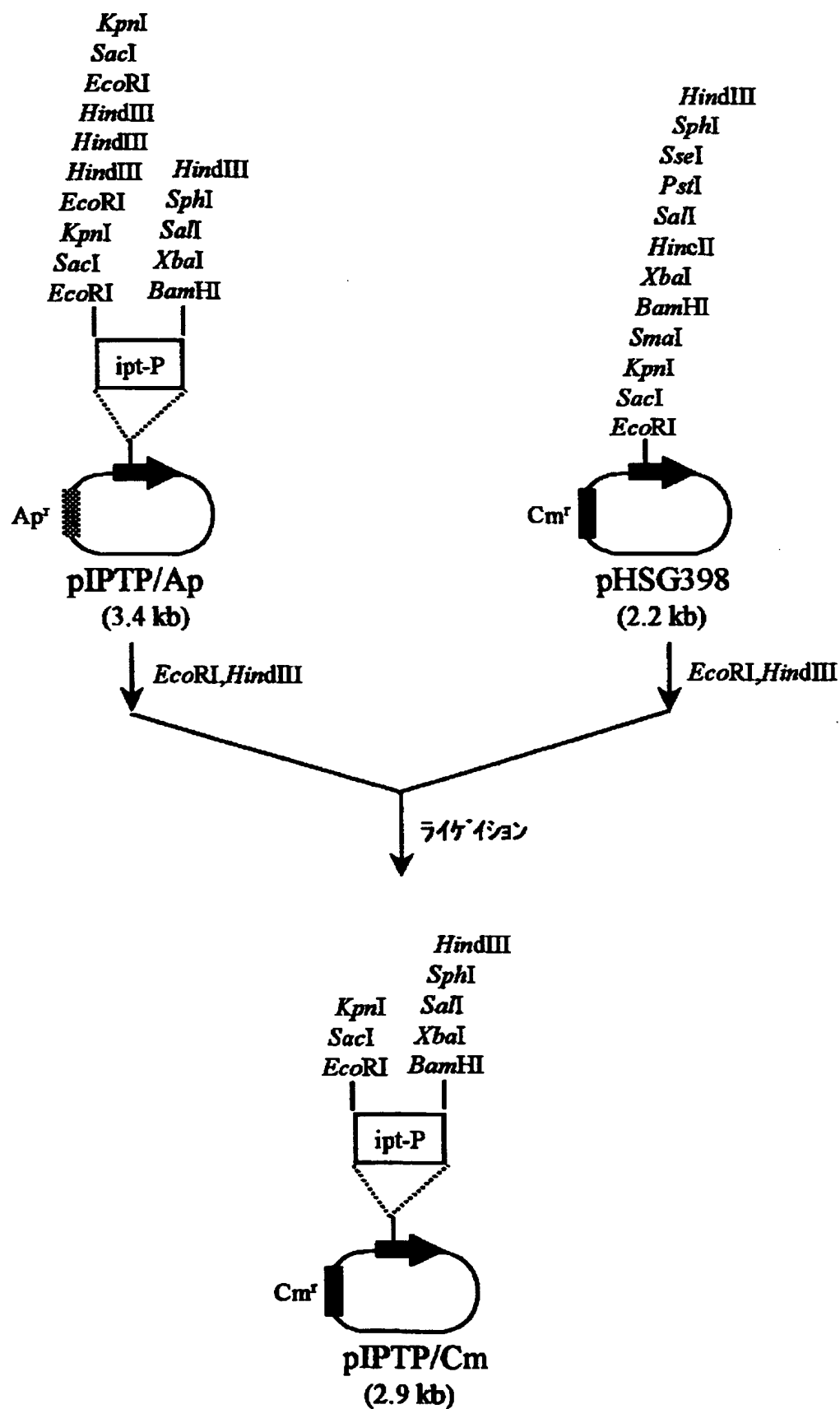
【書類名】 図面

【図 1】

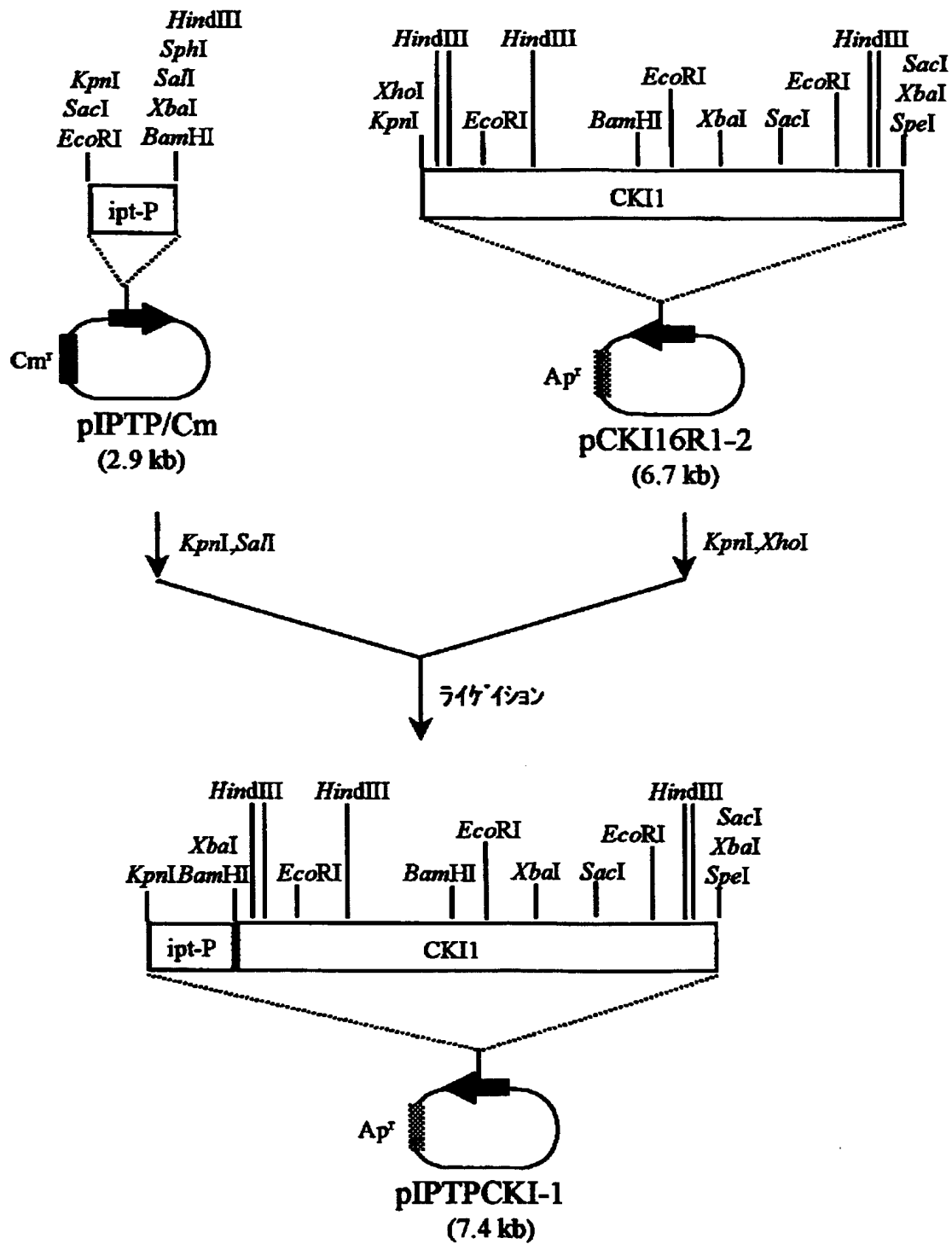




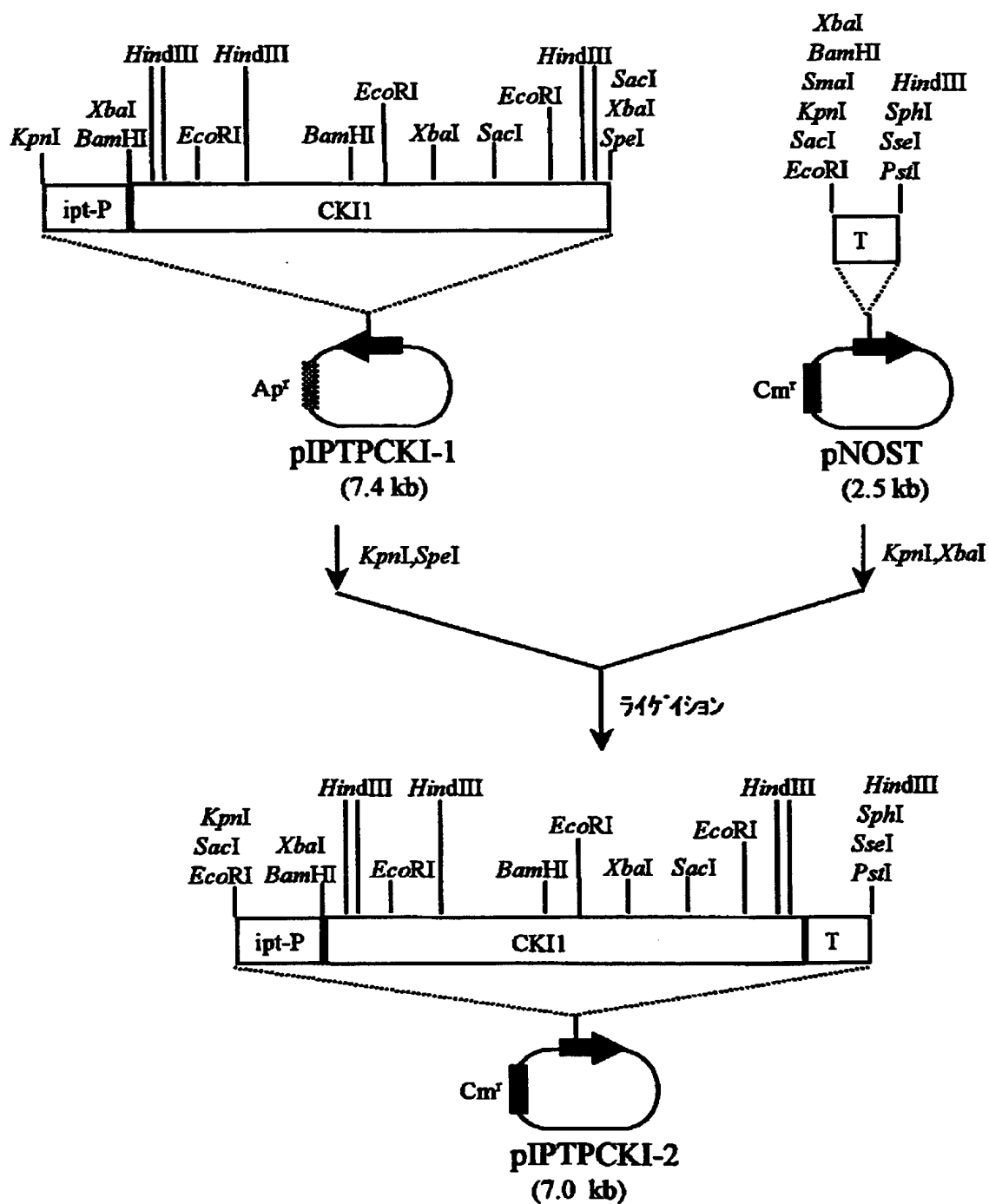
【図 2】



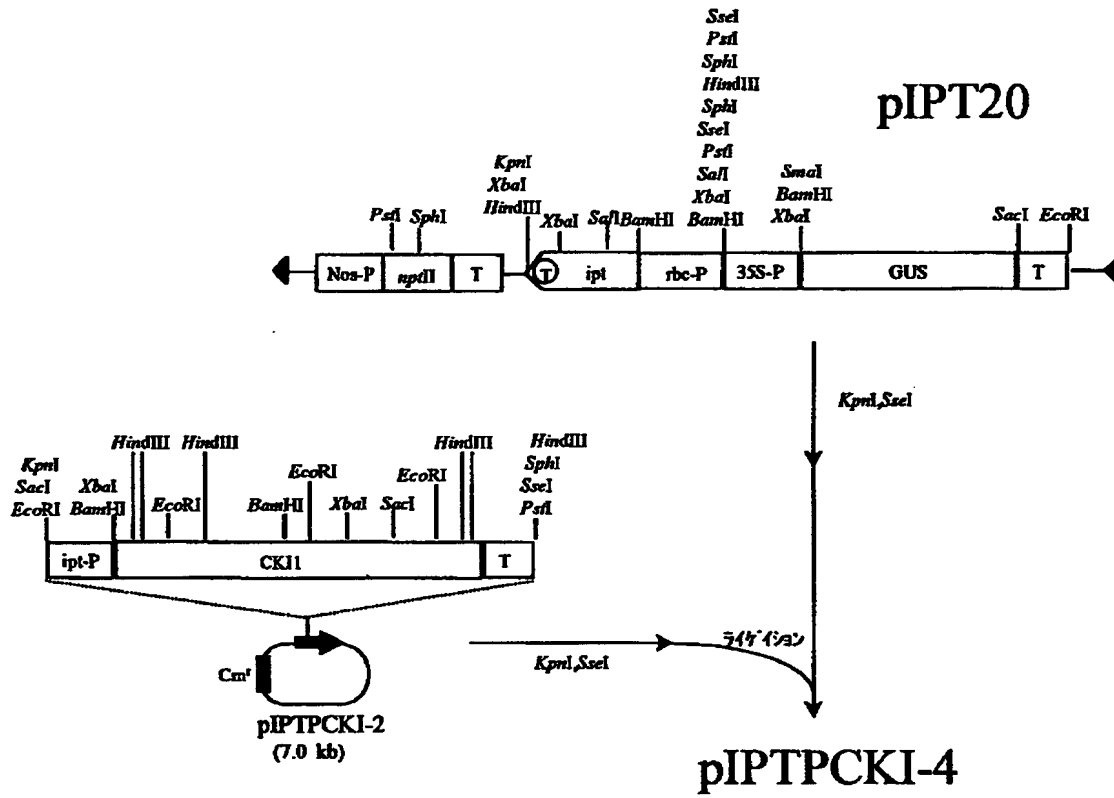
【図 3】



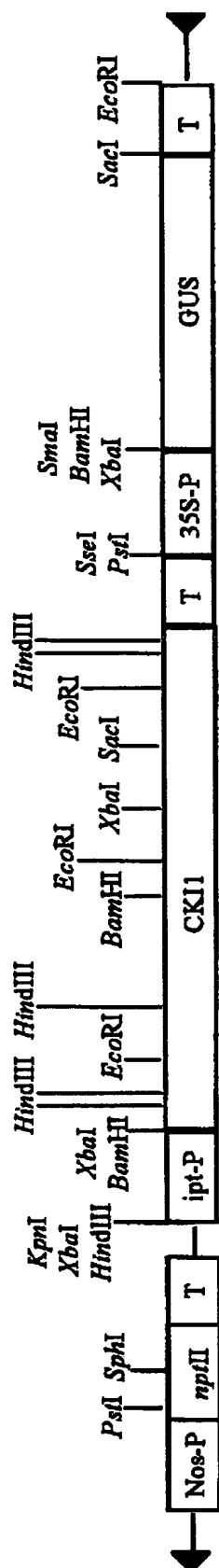
【図 4】



【図 5】

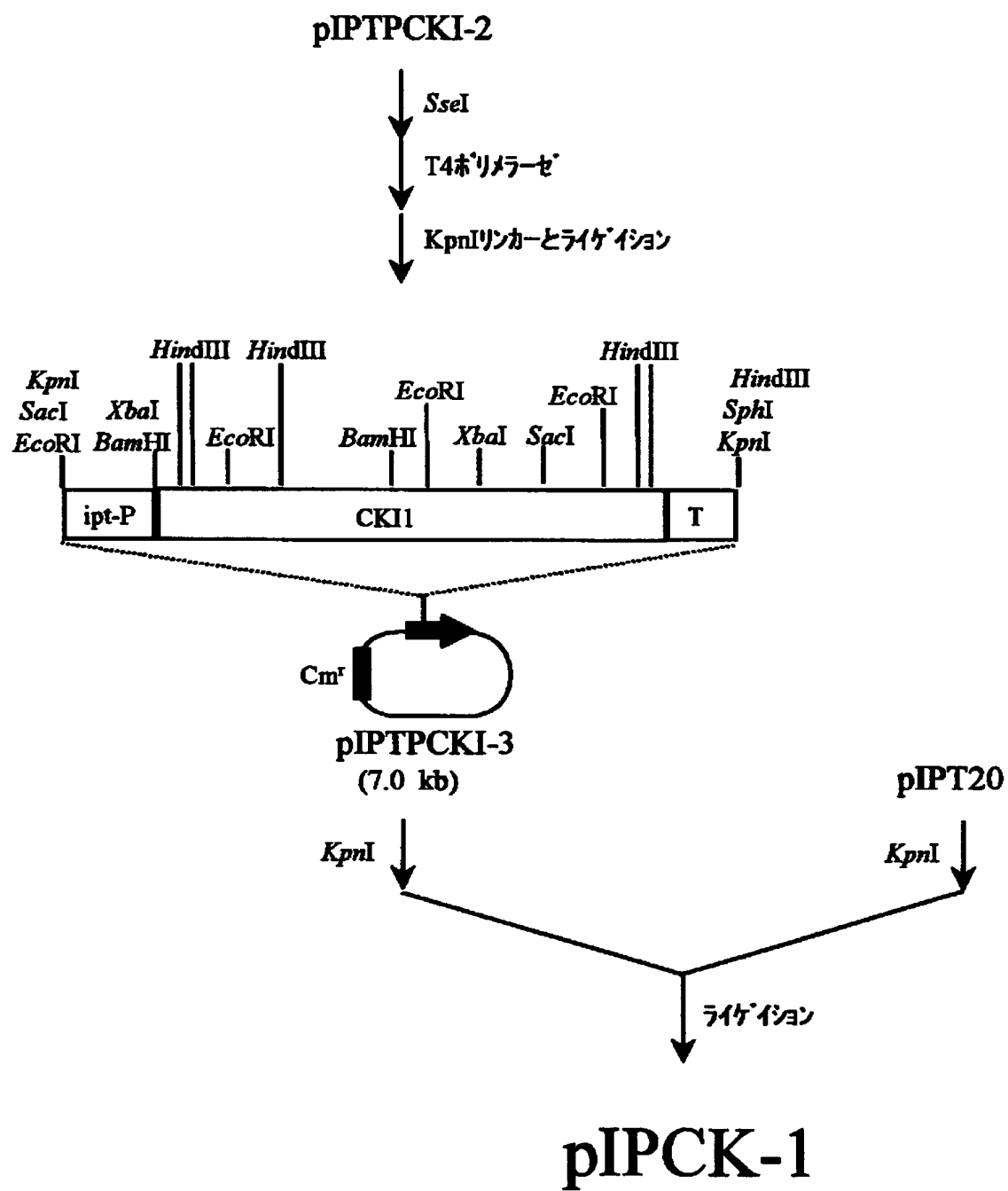


【図 6】



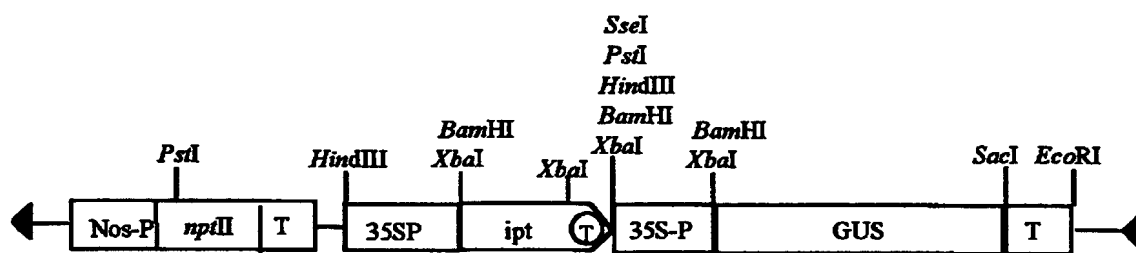
pIPTPCKI-4  
(17.8 kb)

【図 7】



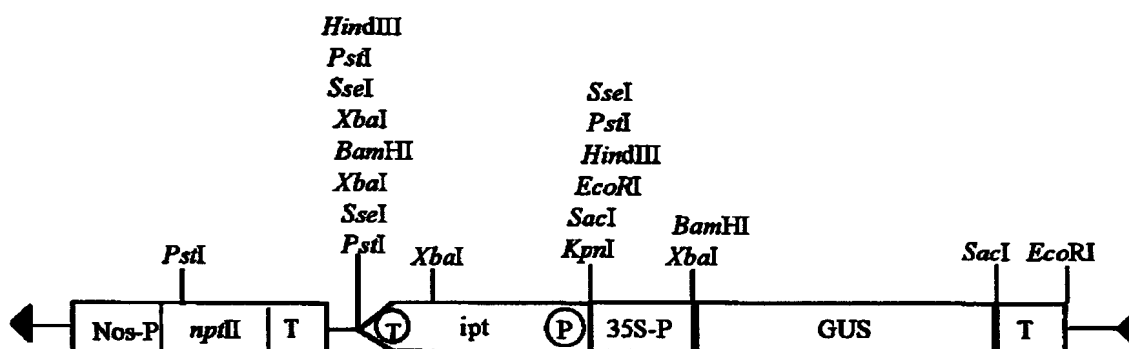


【図 9】



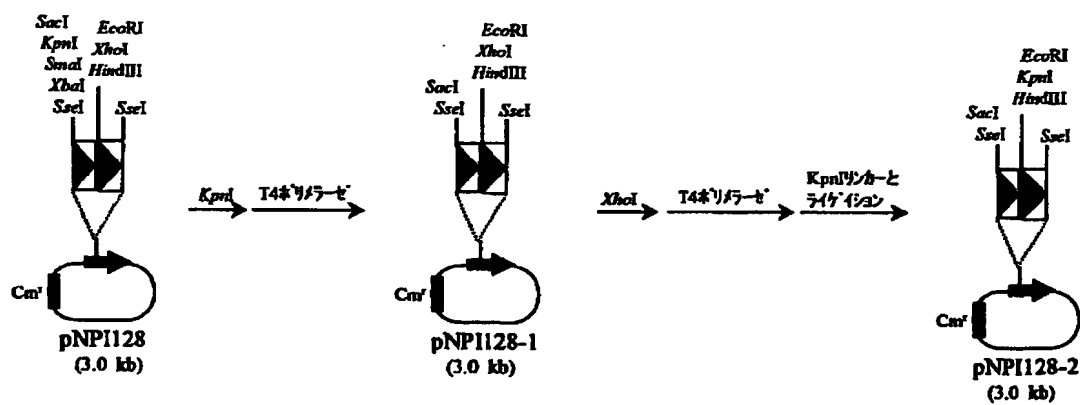
pIPT5  
(15.1 kb)

【図 10】



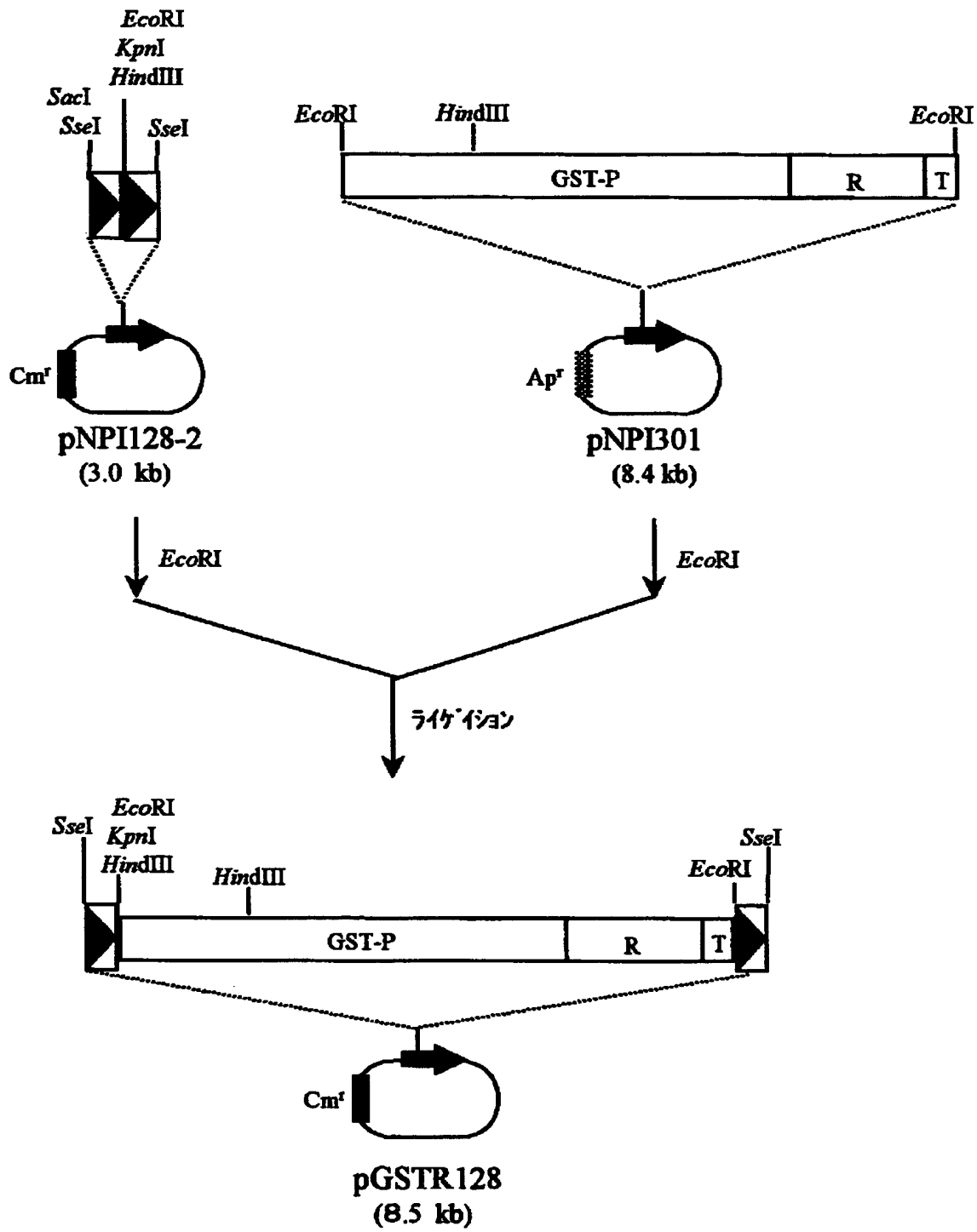
pIPT10  
(14.9 kb)

【図 11】

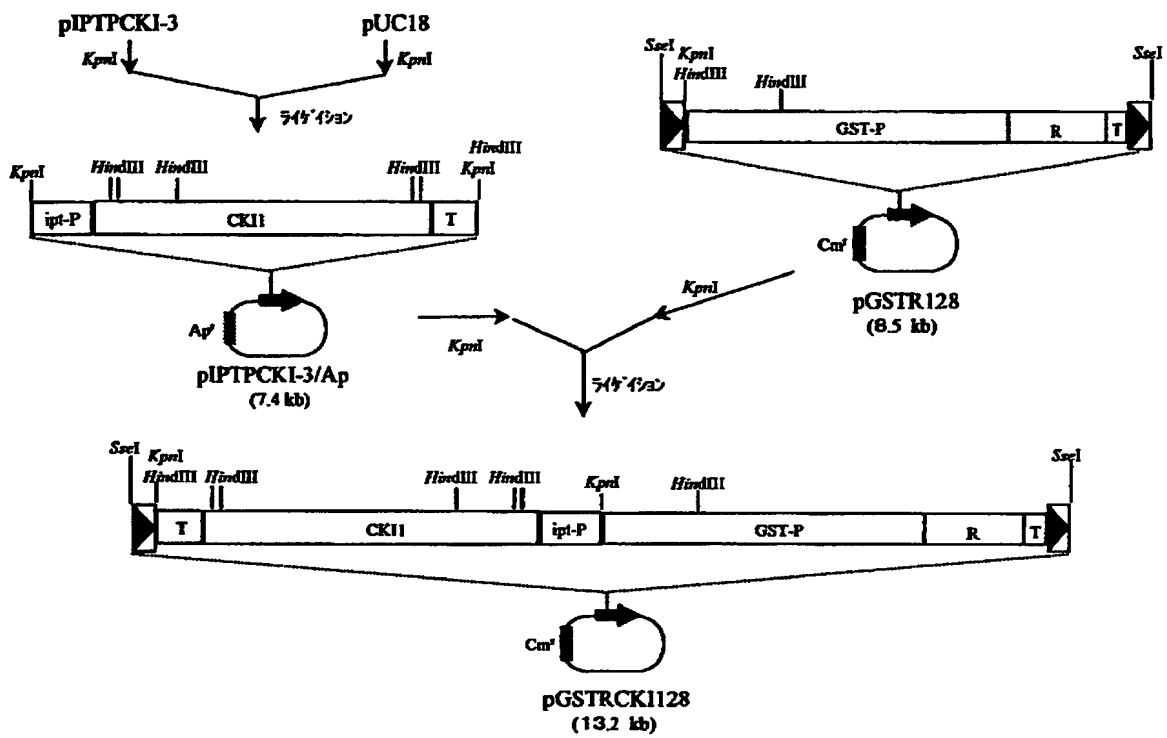




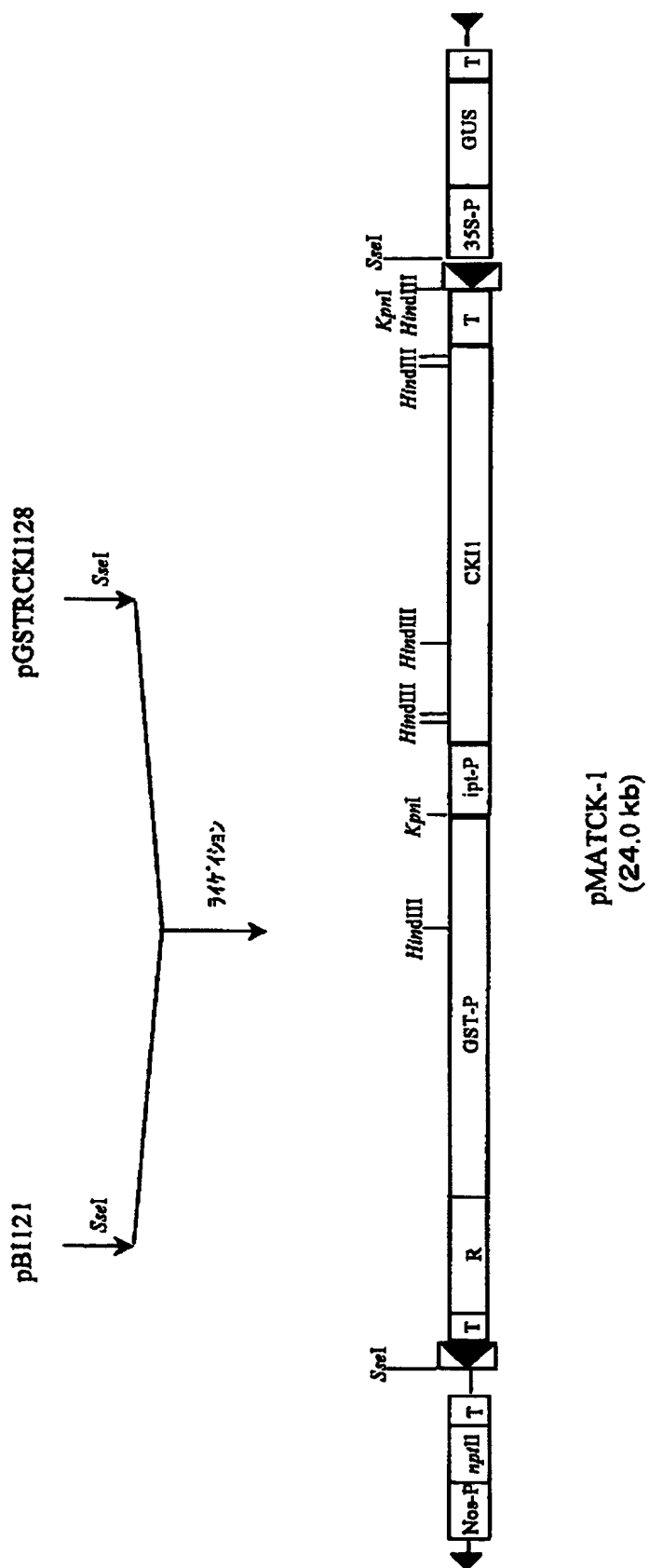
【図 12】



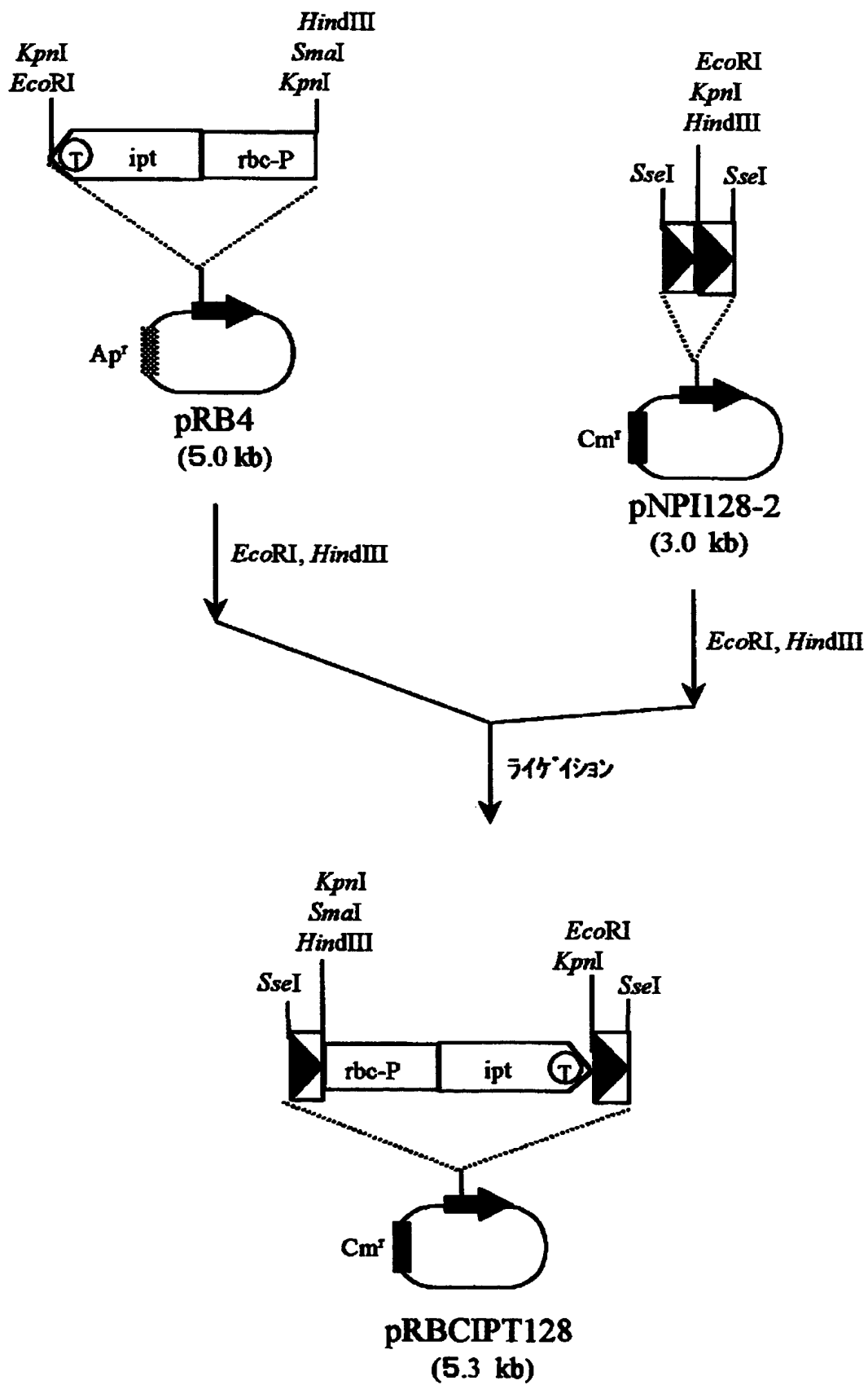
【図 1 3】



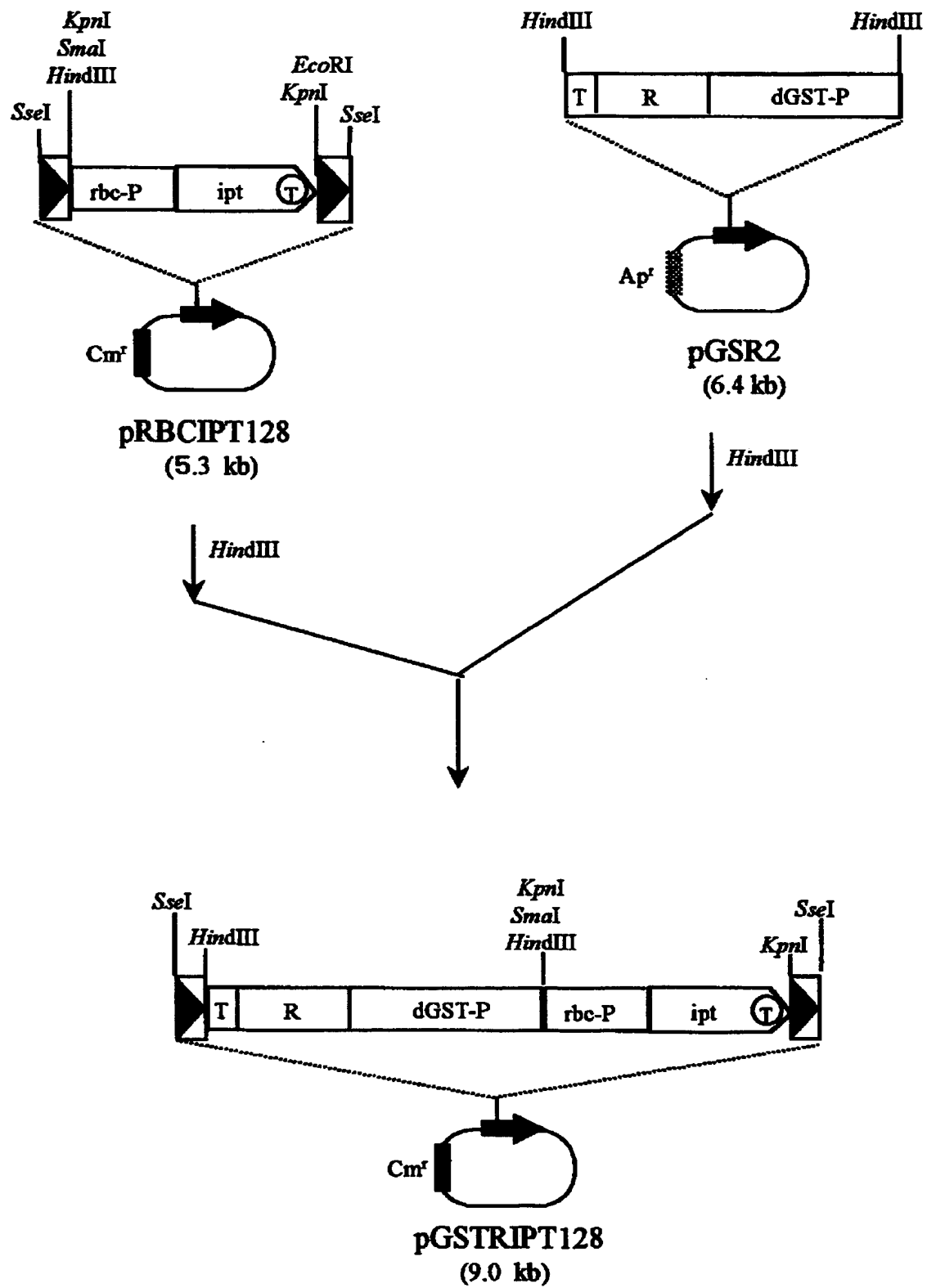
【図 1 4】



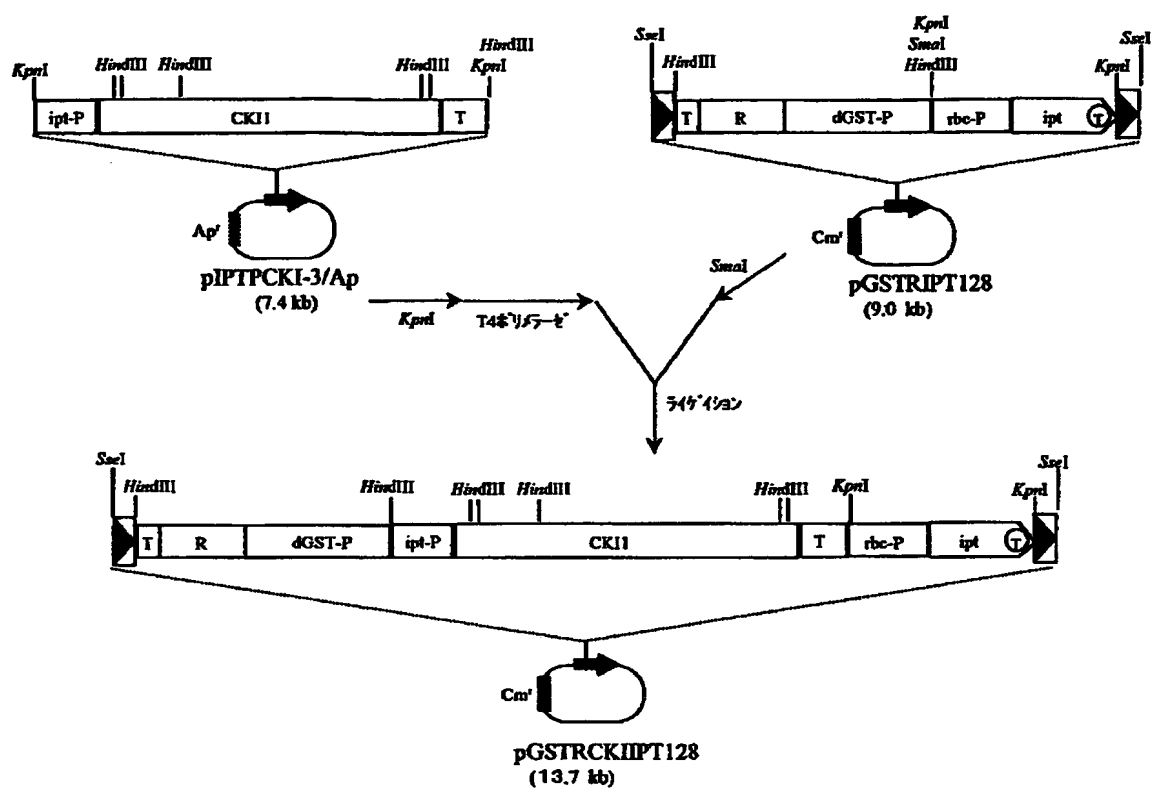
【図 15】



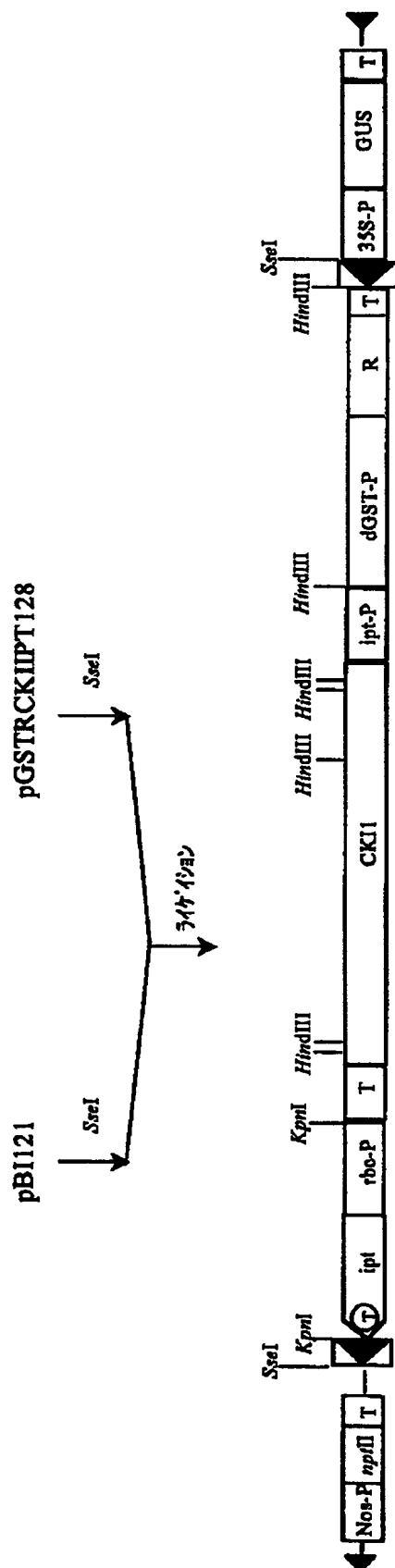
【图 1 6】



【図 1 7】



【図 1 8】



pMATIPCK-1  
(24.5 kb)

特平 1 1 — 3 4 3 9 3 7



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 植物細胞の活性を低下させる物質を用いることなく、容易に、かつ、高い効率で遺伝子導入組織を選抜でき、しかもその遺伝子産物の安全性が担保された選抜マーカー遺伝子を有する、植物への遺伝子導入用ベクターを提供する。

同時に、遺伝子導入細胞の選抜後は、その選抜マーカー遺伝子の影響を排除する機能を備え、効率的に目的遺伝子の導入を何度でも繰り返すことができ、また、選抜マーカー遺伝子の影響が排除された遺伝子導入植物を容易に作成することができる、植物への遺伝子導入用ベクターを提供する。

【解決手段】 植物遺伝子導入用ベクターにおいて、選抜マーカー遺伝子として植物ホルモンシグナルトランスダクション系遺伝子を独立して、又は脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に組込んで用いる。

【選択図】 図6

特平 11-343937

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第343937号
受付番号	59901179027
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年12月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年12月 2日
-------	-------------

特平 1 1 - 3 4 3 9 3 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 1 8 3 4 8 4 ]

1. 変更年月日	1 9 9 3 年 4 月 7 日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都北区王子 1 丁目 4 番 1 号
氏 名	日本製紙株式会社